

胃切除マウスの肝臓におけるCytochrome P450の特性とその薬物動態に及ぼす影響

著者	石井 敬
学位名	博士（薬学）
学位授与機関	星薬科大学
学位授与年度	2013年度
学位授与番号	32676甲第168号
URL	http://id.nii.ac.jp/1240/00000674/

**胃切除マウスの肝臓における Cytochrome P450 の特性と
その薬物動態に及ぼす影響**

Characteristics of hepatic Cytochrome P450 and
its effect on pharmacokinetics in gastrectomized mice

D102 石井 敬 (Ishii, Makoto)

論文内容の要旨

薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) は、肝臓での発現が高い酵素であり、様々な薬物の代謝に関与している。また、CYP は胆汁酸やステロイドホルモン、ビタミン D などの生体内物質の代謝にも関わっており、生体の恒常性維持に対しても重要な役割を担っている。したがって、CYP の発現量や活性の変動要因を把握しておくことは、薬物代謝の面ばかりではなく、生体の恒常性維持の面からも非常に重要なことである。

CYP の発現量や活性は、Single Nucleotide Polymorphism (SNP) などの遺伝的要因に加えて、薬物、疾病、加齢などにより変動することが知られている。当教室では、腸内細菌が CYP の変動要因になり得ることを初めて見出したが、この腸内細菌は、抗菌薬、食事、疾病、加齢、ストレスなどによって変動することが知られている。したがって、腸内細菌の変動要因と CYP の変動要因との関係を明確にすることによって、これまで知られている CYP の変動要因に加えて新たな変動要因を提示することができる。これまで当教室では、腸内細菌の生息している specific pathogen free (SPF) マウスと腸内細菌の生息していない germ free (GF) マウスの肝臓における CYP3A の発現量を比較し、GF マウスでは CYP3A の発現量が著明に低下していることを明らかにしている。さらに、この CYP3A の発現変動は、腸内細菌が産生するリトコール酸 (LCA) に起因していることを明らかにしている。また、抗菌薬や食事が腸内細菌を変動させ、CYP の発現量を変動させることも明らかにしている。これらの成果は、腸内細菌の変動という消化管でのイベントが、肝臓における CYP の発現量を変動させ、

薬物動態の変動要因の一つになり得ることを初めて見出したものである。

本研究は、胃切除によって腸内細菌が変動するとの報告をもとに、胃切除患者においては肝臓の CYP の発現が変動しているのではないかと予測し、その立証を試みたものである。まず、胃切除モデルマウスを作製し、肝臓における CYP 分子種の発現量を 24 週間にわたり調べた。次に、胃切除モデルマウスにおける CYP の発現変動が腸内細菌の変動に起因したものであるかどうかを調べた。さらに、胃切除によって起こる CYP の発現変動が、薬物の体内動態にどのような影響を及ぼすかについて調べた。

1) 肝臓における CYP の発現に及ぼす胃切除の影響

まず、ICR マウスをペントバルビタールで麻酔し、胃を切除後、食道と腸管を吻合することによって胃切除モデルマウスを作製した。

胃切除群の摂餌量は、sham operation 群とほぼ同じであった。しかしながら、胃切除群の体重は、ほとんど増加せず、24 週目においては、sham operation 群に比べて約 40% 低下していた。この体重の低下は、胃切除によって胃酸や消化酵素の分泌が不足し、食物が十分消化されず、栄養素が吸収できなかったことや、胃で産生される腸管運動を促進するグレリンが減少したためであると考えられた。一方、肝体重比はいずれの期間においても、胃切除群と sham operation 群との間に差は見られなかった。このように、本研究で作製した胃切除マウスは、胃切除患者に類似した特徴を呈していた。

次に、胃切除マウスの肝臓における CYP 分子種の発現変動を経時的に調べた。術後 2 週目および 4 週目における肝臓の CYP3A11、CYP1A2、CYP2C29 および CYP2D22 の mRNA 発現量は、いずれも胃切除群と sham operation 群の間に変化が見られなかった。これに対して、胃切除後 12 週目および 24 週目の肝臓においては、いずれの CYP 分子種も sham operation 群に比べて著しい発現増加が見られた。また、CYP3A、CYP1A、CYP2C および CYP2D のタンパク質発現量も、mRNA 発現量と同様に増加することがわかった。以上の結果から、胃切除により、各種 CYP 分子種の発現量が増加し、この増加は少なくとも 24 週目までは続くことが明らかとなった。

2) 胃切除後の CYP3A の発現変動と腸内細菌および LCA との関係

胃切除により肝臓の各種 CYP 分子種が増加することがわかった。これら CYP 分子種のうち、CYP3A は肝臓に最も多く存在し、薬物の代謝において最も重要

な役割を担っている。加えて、LCA によって発現が制御されていることがわかっている分子種である。そこで、この CYP3A に焦点を絞り、肝臓の CYP3A の発現増加に腸内細菌が関与しているかどうかを検討した。具体的には、大腸内の LCA 産生菌 *Bacteroides fragilis* 量と LCA 量を測定し、肝臓の CYP3A の発現量と相関しているかどうかを調べた。その結果、大腸内の *Bacteroides fragilis* 量も LCA 量も、胃切除後 4 週目までは変化が見られなかったものの、12 週目以降では有意に増加することがわかった。また、これらの変動は、肝臓の CYP3A の発現変動と一致していた。これらのことから、胃切除マウスにおける肝臓の CYP3A の発現増加には、大腸内の LCA 産生菌と LCA 量の増加が関与していることが示唆された。このことをさらに明確にする目的で、核内受容体 pregnane X receptor (PXR) の核内移行について解析した。PXR は LCA が結合すると細胞質から核内へと移行し、標的配列に結合することで、CYP3A の転写を活性化することが知られている。PXR の核内移行量を解析した結果、PXR の核内移行量は、胃切除後 4 週目までは変化しなかったものの、12 週目以降では増加すること、およびこの変動パターンが CYP3A のそれと酷似していることがわかった。さらに、このことを裏打ちするために PXR によって発現が制御されているトランスポーター ATP-binding cassette, sub-family C (MRP), member 3 (ABCC3) の変動も調べた。その結果、ABCC3 の mRNA 発現量も、PXR の変動パターンと同様の挙動を示すことがわかった。これらのことより、胃切除による CYP3A の発現変動には腸内細菌が関与していることが明確になった。

3) CYP3A の発現増加が基質薬物の代謝に及ぼす影響

これまで、胃切除患者の薬物動態に関しては、胃がないことにより胃から小腸に薬物が送られる速度 (GER) が非常に速くなり、薬物の吸収速度が上昇するため、最高血中濃度到達時間 (T_{max}) が短縮し、最高血中濃度 (C_{max}) が上昇することが知られている。しかしながら、胃酸分泌の消失や低下による薬物動態の変動については全くわかっていなかった。そこで、胃切除による CYP3A の発現増加が薬物動態にどの程度影響を及ぼすかについて検討した。

まず、胃切除マウスの肝臓における代謝活性能の変動について調べた。CYP3A の基質薬物である triazolam を用いて代謝活性能を調べた結果、代謝活性能が約 2 倍上昇することがわかった。この結果は、肝臓で主に代謝される薬物を服用した場合、代謝が 2 倍程度速くなり、薬物の血中からの消失が速まり、薬の効果が減弱する可能性を示唆している。




次に、CYP3A で代謝される抗がん剤 **imatinib** を経口投与し、体内動態を調べた。胃切除群においては、 C_{max} の増加、 T_{max} の短縮が起こり、**imatinib** の吸収が亢進していることがわかった。これらの変化は、すでに報告されている GER の短縮に起因したものであり、この点に関しては、臨床においてはすでに十分配慮されていることである。一方、胃切除群では、**sham operation** 群に比べて、消失速度定数の上昇と半減期の短縮が認められた。これらの変化は、胃切除群において **imatinib** の代謝が亢進していることを示しており、CYP3A の発現増加を反映したものである。この点に関しては、これまで全く知られていなかったことであり、臨床では注視されていなかったことである。そこで、この変動が薬効にどの程度影響を及ぼすかについて考察した。具体的には、本研究で得られた薬物動態学的パラメータを用いて **imatinib** の反復投与時における血中濃度に関するシミュレーションを行った。その結果、定常状態における血中濃度が、胃切除群では **sham operation** 群と比べて約 30% 低下することがわかった。この結果は、胃切除患者に対して健常人と同じ投与量で薬物を投与した場合、健常人に比べて定常状態における血中濃度が約 30% 低下する可能性を示しており、血中濃度を厳密にコントロールする必要性のある薬物においては、薬効が著しく減弱する可能性を示唆している。

本研究の結果から、胃切除モデルマウスの肝臓においては、CYP3A の発現量が術後 12 週目から増加し、この発現増加は少なくとも 24 週目までは持続することがわかった。また、この発現増加には、消化管の pH の上昇に伴う LCA 産生菌の増殖が関与していることが明らかになった。さらに、この発現増加によって CYP3A で代謝される薬物の肝クリアランスが増加し、定常状態における血中濃度が約 30% 低下する可能性が示唆された。

本研究の結果は、胃切除患者における薬物の適正使用に資するものと考えられるが、動物実験の域を出ず、本研究によって明らかにされた CYP の変動が胃切除患者においても起こり得るものであるかどうかについては、今後、臨床現場において詳細に検証する必要があると考える。

学位授与機関	星薬科大学
氏名（本籍）	イシイ マコト 石井 敬（千葉県）
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	甲 第168号
学位授与年月日	平成26年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者
学位論文の題名	胃切除マウスの肝臓におけるCytochrome P450の特性とその薬物動態に及ぼす影響

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名		石井 敬	
論文審査担当者	主 査 教 授	杉山 清	
	副 査 教 授	辻 勉	
	副 査 教 授	高山 幸三	
題 目	胃切除マウスの肝臓における Cytochrome P450 の特性とその薬物動態に及ぼす影響		
<p>薬物代謝酵素 Cytochrome P450 (CYP) は、肝臓での発現が高い酵素であり、様々な薬物の代謝に関与している。当教室では、腸内細菌が CYP の変動要因になり得ることを初めて見出しているが、この腸内細菌の変動要因と CYP の変動要因との関係を明確にすることによって、これまで知られている CYP の変動要因に加えて新たな変動要因を提示することができる。本研究は、胃切除によって腸内細菌が変動するとの報告をもとに、胃切除患者においては肝臓の CYP の発現が変動しているのではないかと仮説を立て、その立証を試みたものである。</p> <p>まず、胃切除モデルマウスを作製し、肝臓における CYP 分子種の発現変動を経時的に調べた。術後 2 週目および 4 週目における肝臓の CYP3A11、CYP1A2、CYP2C29 および CYP2D22 の mRNA 発現量は、いずれも胃切除群と sham operation 群の間に変化が見られなかった。これに対して、胃切除後 12 週目および 24 週目の肝臓においては、いずれの CYP 分子種も sham operation 群に比べて著しい発現増加が見られた。さらに、これら CYP 分子種のタンパク質発現量も、mRNA 発現量と同様に増加することがわかった。</p> <p>次に、CYP3A に焦点を絞り、肝臓の CYP3A の発現増加に腸内細菌が関与しているかどうかを検討した。その結果、大腸内の <i>Bacteroides fragilis</i> 量も LCA 量も、胃切除後 4 週目までは変化が見られなかったものの、12 週目以降では有意に増加することがわかった。さらに、これらの発現変動が、肝臓の CYP3A の発現変動と一致していることも示された。これらのことから、胃切除マウスにおける肝臓の CYP3A の発現増加には、大腸内の LCA 産生菌と LCA 量の増加が関与していることが示唆された。</p> <p>そこで、このことをさらに明確にする目的で、核内受容体 pregnane X receptor (PXR) の核内移行について解析した。その結果、PXR の核内移行量は、胃切除後 4 週目までは</p>			

変化しなかったものの、12 週目以降では増加すること、およびこの変動パターンが CYP3A のそれと酷似していることがわかった。LCA は PXR のリガンドとなり PXR の核内移行を促進することによって CYP3A の発現を増加させることから、胃切除に伴う CYP3A の発現増加には腸内細菌が関与していることが明確になった。

最後に、胃切除による CYP3A の発現増加が薬物動態にどの程度影響を及ぼすかについて検討した。まず、CYP3A の基質薬物である triazolam を用いて代謝活性を調べた結果、肝臓における CYP3A の代謝活性が約 2 倍上昇することがわかった。次に、CYP3A で代謝される抗がん剤 imatinib を経口投与して体内動態を調べた。その結果、定常状態における血中濃度が、胃切除群では sham operation 群と比べて約 30% 低下することが示唆された。この結果は、胃切除患者に対して健常人と同じ投与量で薬物を投与した場合、定常状態における血中濃度が健常人に比べて低下する可能性を示しており、血中濃度を厳密にコントロールする必要性のある薬物においては、薬効が著しく減弱する可能性を示唆している。

本研究の結果から、胃切除モデルマウスの肝臓においては、CYP3A の発現量が術後 12 週目から増加し、この発現増加は少なくとも 24 週目までは持続することがわかった。また、この発現増加には、消化管の pH の上昇に伴う LCA 産生菌の増殖が関与していることが明らかになった。さらに、この発現増加によって CYP3A で代謝される薬物の肝クリアランスが増加し、定常状態における血中濃度が低下する可能性が示唆された。

本研究によって明らかにされた CYP の変動が胃切除患者においても起こり得るものであるかについては、今後、臨床現場において詳細に検証する必要があるが、本研究の結果は、胃切除患者における薬物の適正使用に資するものと考えられる。よって、本論文の内容は博士（薬学）の学位に十分値するものとする。